

東洋大学学術情報リポジトリ Toyo University Repository for Academic Resources

酵母菌の極限環境適応とその応用に関する研究

著者	峯岸 宏明
学位授与大学	東洋大学
取得学位	博士
学位の分野	工学
報告番号	甲第155号
学位授与年月日	2006-03-25
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00003973/

酵母菌の極限環境適応とその応用に関する研究

峯岸宏明

研究背景

圧力生理学 (Piezo-physiology)」とは『圧力』を利用し、それを指標として細胞内で起こるタンパク質相互作用や物質代謝を細胞生理学的手法を用いて他のストレス適応との対比を理解しようというものである。

これまでに、阿部らによって深海酵母が分離され、ポリガラクトツロナーゼ分泌酵母が取得されてきた。また、このような深海酵母の分離源である深海環境は高圧、低温といった極限環境である。このような環境下における酵母の適応は真核生物のモデルである出芽酵母を用いてトリプトファン輸送体 Tat2 のユビキチン化を伴う圧力制御機構が明らかとされてきた。しかしながら、機能未知遺伝子や非必須遺伝子の圧力／低温適応への関与は未だ不明な部分が多い。

そこで本研究では、相模湾および日本海溝におけるポリガラクトツロナーゼ分泌酵母の多様性を理解するため、こうした酵母菌株が系統的にどのような位置付けになるかを調べた。次いで、これまでの知見が蓄積している N6 株のポリガラクトツロナーゼの生化学的な検討を行い、さらにそれが深海でも活性を有する可能性があるのかどうかを確かめるために高圧および低温下における酵素活性を測定した。また、深海環境における酵母の高圧／低温適応を調べるために、高圧／低温下で増殖可能な出芽酵母を用いて DNA マイクロアレイによる全ゲノムの発現レベルならびに非必須遺伝子破壊がもたらす表現型という両側面から網羅的アプローチを試みた。

深海由来ポリガラクトナーゼ分泌酵母の系統解析とその生化学的研究

微生物が産生・分泌する有用物質には、病原菌に対する抗生物質、あるいはプロテアーゼを始めとする各種酵素類など多様な分子・タンパク質種が知られており、現在さらなる新規物質検索のため、新しい有用微生物の分離源やスクリーニング法の開発などに多大な努力が払われている。しかしながら、これまで対象とされてきた大半の微生物は放線菌などのバクテリアであり、酵母菌に関しては、陸生・海洋由来を問わず、こうした応用への試みがなされたことはほとんどなかった。そこで本研究では、深海底泥という極めて特殊な分離源をもとに、このような極限環境に生息する未知の可能性を秘めた酵母菌に焦点を当て、特に分泌性ポリガラクトナーゼに着目した解析を行った。ポリガラクトナーゼはペクチン分解酵素の一種であり、ポリガラクトロン酸をガラクトロン酸に加水分解する。ポリガラクトナーゼは、フルーツジュースの抽出および精澄化のために食品産業において利用されており、また、果汁を加工する際に、大量廃棄される果皮などの残渣による環境問題への利用にも期待されている。

これまでに、相模湾（深度 1100～1400 m）および日本海溝（深度 4500～6500 m）において、多数の深海酵母が分離されてきた。これらの 26S rDNA 塩基配列をもとに系統解析を行った結果、7 種の担子菌酵母と 5 種の子囊菌酵母の近縁種が分離されていることが分かった。これらのうちポリガラクトナーゼ活性を有する菌株は 15 菌株存在し、*Rhodosporidium diobovatum*、*Aureobasidium pullulans* および *Cryptococcus liquefaciens* の 3 種であることがわかった。

15 菌株中 *Cr. liquefaciens* であると推定された N6 株については、三浦らによりそのポリガラクトナーゼである p36 および p40 が精製され、諸性質とそれぞれの N 末端アミノ酸配列が調べられた。しかしながら、それらの酵素反応

速論的パラメーターや、N6 株が分離された深海環境を特徴づける“高圧”および“低温”という条件がこれらのポリガラクトナーゼ活性にどのような影響をおよぼすかは明らかになっていない。そこで本研究では、対照としてコウジカビである *Aspergillus japonicus* 由来のポリガラクトナーゼ (Aj-PGase) を用いて、各酵素活性の V_{max} および K_m 値を測定した。次いで、酵素活性の温度依存性および圧力依存性を調べた。その結果、40℃における p36、p40 および Aj-PGase の V_{max} はそれぞれ、1.8、0.21 および 1.6 U であった。 K_m 値はポリガラクトン酸濃度でそれぞれ 1.4 (p36)、0.7 (p40) および 3.6 mg/ml (Aj-PGase) であった。このように、p36 を p40 の K_m 値が非常に低いことは、これらが Aj-PGase に比べポリガラクトン酸への親和性が高いことを示している。また、至適温度は p36、p40 および Aj-Pgase とともに 50℃であった。ところが、p36 および p40 いずれも Aj-PGase に比べ、0~10℃における活性が有為に高く、アウレニウスプロットから求められた活性化エネルギーはそれぞれ、20.6 と 23.7 kJ/mol だった。一方、Aj-PGase の活性化エネルギーは 31.4 kJ/mol と高い値を示した。このことは p36 や p40 がより低温に適応した酵素であることを示唆している。一方、高圧条件におけるポリガラクトナーゼ活性を測定したところ、p36 では 25、50、100 MPa と圧力をあげてもポリガラクトナーゼ活性はほとんど低下せず、常圧とほぼ変わらない安定な活性を示した。同様の結果が p40 についても得られた。意外にも Aj-PGase 活性は高圧負荷によりやや促進される傾向にあった。

以上の結果は、深海由来のポリガラクトナーゼである p36 と p40 は基質であるポリガラクトン酸の濃度が低くても効率よく機能し、また低温および高圧という深海底に特徴的な条件下でも十分に活性を有する可能性を示唆している。

DNA マイクロアレイと遺伝子破壊ライブラリーを用いた出芽酵母の高圧／低温応答に関する網羅的解析

出芽酵母の高圧適応には Tat2 の発現が深く関わっているが、酵母には約 6000 の遺伝子があり、機能未知遺伝子も数多く存在するため、TAT2 以外にも圧力適応に関与する遺伝子が存在する可能性が高い。さらに、前述のように TAT2 高発現により、高圧増殖能のみならず低温増殖能も獲得することから、こうした条件下での増殖を可能にするメカニズムの解明は、高圧・低温という深海環境に生息する生物の適応機構といった観点からも興味深い。

そこで本研究では、高圧適応に関する新たな遺伝子の探索および高圧、低温の遺伝子レベルでの相互関係を明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いた全ゲノムの発現レベルならびに非必須遺伝子がもたらす表現型という両側面から網羅的な解析を行った。

両解析の結果について、MIPS による機能分類を行ったところ、破壊ライブラリーによる解析から高圧条件下において感受性を示す破壊株は代謝や転写に関わる遺伝子の占める割合が多く、低温条件下においても同様であった。一方、DNA マイクロアレイにおいては、高圧条件下において発現量が上昇した遺伝子はタンパク質、代謝に関する遺伝子が多く、低下した遺伝子は代謝、転写に関するものが多かった。また、低温条件下においても高圧条件下と同様で、高圧と低温に応答する遺伝子の発現パターンを比較してみると類似していることがわかった。破壊株および DNA マイクロアレイとも代謝に関わる遺伝子が多かったものの、高圧・低温応答に必須な遺伝子は、同条件下で発現誘導される遺伝子とは一致しなかった。

また、これらの遺伝子を個別に見てみると、ヒートショック遺伝子で高圧誘導がみられた。これら遺伝子の中でも *HSP104*、*HSP30*、*HSP42* は特に発現量が上昇しており、それに対して *HSP26* および *HSP31* の発現量は減少していた。

野生型とこれら遺伝子のうち非必須な破壊株に対して高圧下における増殖を調べたところ、高圧増殖能において破壊株と野生株の間に大きな差は見られなかった。しかしながら、*hsp31* 破壊株では高圧における世代時間が野生株の約 2 倍であった。この結果から、Hsp31 は非致死的な圧力条件下においては細胞の増殖に部分的に役割を果たしていると考えられる。一方、125 MPa における耐圧性においては、野生株の生存率は 1%程度に減少し、同様に *hsp31* 破壊株も 0.5%程度に減少していた。ところが予想外なことに、残りの破壊株は野生株よりも生存率が約 5 倍高かった。これは HSP 遺伝子の欠損によって 125 MPa における耐圧性を獲得できたことを意味している。

高圧／低温条件下における膜エルゴステロールの重要性

出芽酵母のエルゴステロール生合成経路においては、後期課程を担う、*ERG6*、*ERG2*、*ERG3*、*ERG5* および *ERG4* 遺伝子は破壊可能であり、これらのうち *erg6*、*erg2* および *erg3* 破壊株は顕著な高圧／低温感受性を示し、25 MPa, 30℃あるいは 0.1 MPa, 15℃において増殖速度が低下する。また、細胞周期をみると、常圧と比較し G₁ 期の細胞が増えていた。これはエルゴステロールが細胞分裂周期プログレッションにおいて不可欠であることを意味している。一方、低温条件下においては、*erg* 破壊株では増殖速度はおちても、いずれも細胞周期の位置は常温のそれとほとんど変わりなく、圧力の影響とは異なっていることが分かった。また、これら *erg* 破壊株に *TAT2* を高発現させても、高圧または低温下における増殖の回復はほとんど見られなかった。従って、*ERG* 遺伝子の破壊による高圧／低温感受性はトリプトファンに起因しないことが分かった。

また、高圧／低温に顕著な感受性を示した *erg6*、*erg2* および *erg3* 破壊株について Pma1 の局在およびプロトン排出活性を調べた結果、Pma1 発現量は野生型株との間に顕著な差異は認められず、*erg6* 破壊株においては Pma1 活性が

著しく低下していることが分かった。また、有機弱酸を用いて *erg* 破壊株の増殖を調べ結果、有機弱酸濃度が上がるにつれ *erg6*、*erg2*、*erg3* 破壊株は顕著な感受性を示した。一方、*trp1* 破壊株は感受性を示さなかったことから、有機弱酸による *erg* 破壊株のストレス応答は膜構造に起因しないこと推測できる。これは、高圧／低温ストレスにより通常の野生株よりも膜の流動性が低下したことが原因であると考えられる。つまり、*erg* 破壊株の高圧／低温感受性は膜の流動性低下によって起こると考えられる。

また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを用いて、*erg* 破壊株の増殖を調べた結果、0.1 mM 以上のシクロヘキシミド存在下で *erg6*、*erg2*、*erg3* および *erg4* 破壊株が顕著な感受性を示した。一方、*erg5* 破壊株は 0.5 mM のシクロヘキシミド存在下でも野生株と同程度の耐性を有していた。また、*trp1* 破壊株はシクロヘキシミドに対しても耐性を示していたことから、シクロヘキシミドも *erg* 破壊株の膜構造に直接影響を与えていないと考えられる。ローダミン 6 G を用いた透過性の実験も同様の結果が得られたことから、膜の物質透過性は化学物質の種類とエルゴステロール前駆体の種類によって異なるものと考えられる。

また、これら破壊株の含有ステロールの解析を行ったところ、高圧あるいは低温下において野生型、*erg* 破壊株ともにステロール量が増加していることがわかった。しかしながら、*erg* 破壊株の示すステロールの波形パターンは異なり、*erg* 破壊株は細胞膜上に野生型とは異なるステロールを蓄積していることが考えられる。